

INFLUENCIA DEL DÍA DE INICIO DEL TRATAMIENTO EN LOS RESULTADOS DE SUPEROVULACIÓN EN VACAS LECHERAS

INFLUENCE OF THE DAY OF THE BEGINNING THE TREATMENT IN THE RESULTS OF SUPEROVULATION IN DAIRY CATTLE

Díaz, C., L.A. Quintela, A.I. Peña, J.J. Becerra y P.G. Herradón

Área de Reproducción y Obstetricia. Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria de Lugo. 27002 Lugo. España.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Transferencia de embriones.

ADDITIONAL KEYWORDS

Embryo transfer.

RESUMEN

Se comparan dos momentos de inicio, dentro del periodo que se establece como adecuado (8 a 14 días después del estro), del tratamiento superovulatorio en hembras donantes de embriones.

Se han utilizado vacas de raza Holstein Friesian, en condiciones similares de manejo y alimentación. Sometidas a un tratamiento superovulatorio con FSH, iniciado en 16 animales el día 8 y en otros 16 el día 12 del ciclo y tras la recogida de los embriones, mediante un método transvaginal, y su transferencia a las receptoras, se ha comprobado que iniciando el tratamiento en el día 12, se obtienen resultados muy superiores a los observados cuando se comienza en el día 8, principalmente en lo que se refiere al número de embriones transferibles obtenidos, así como en el porcentaje de gestaciones en las hembras receptoras.

SUMMARY

We have tried to compare two moments for the beginning of the superovulatory treatment in

bovine embryos donors, within the period established as adequate (8 to 14 days later of the heat).

In order to carry out this work 32 Holstein Friesian cows have been used. All were kept in similar conditions of handling and feeding, They were given a superovulatory treatment with FSH. In 16 animals the beginning day was day 8 and in 16 animals the beginning day was day 12 of the cycle. After the collection of the embryos, through a closed system, and their transference to the recipients, we could check that beginning the treatment in the day 12 the number of transferable embryos and the pregnancy rate were very superior to those observed when the treatment was begun on the day 8.

INTRODUCCIÓN

La transferencia de embriones cobra cada día mayor importancia en la actividad de los veterinarios especialistas en reproducción.

En los últimos años se han conse-

guido superar muchas barreras en determinados aspectos relacionados con el éxito en la utilización de estas técnicas, como son los relacionados con los métodos de recogida y transferencia de los embriones, el cultivo y conservación a largo plazo de éstos, etc. Sin embargo, uno de los campos en que menos se ha evolucionado ha sido en el momento idóneo para iniciar el tratamiento superovulatorio, con el fin de conseguir que el mayor número de animales tengan una alta respuesta superovulatoria.

Respecto al momento de inicio del tratamiento, se ha comprobado la determinante influencia que tiene la presencia de un folículo dominante en la respuesta superovulatoria, que es mayor cuando el folículo no tiene capacidad de dominancia funcional sobre el resto de los folículos susceptibles de responder a las hormonas exógenas, en el momento de iniciar el tratamiento (Bungartz y Nieman, 1994; Fricke *et al.*, 1994). El examen ecográfico de los ovarios antes de iniciar la superovulación permite comprobar la presencia o no de un folículo dominante, pero una sola observación no es suficiente para asegurar si existe dominancia funcional o si ésta es tan sólo morfológica (Saumade, 1995). Esto implica que sería necesario un seguimiento ecográfico a lo largo de varios días para comprobar que el folículo dominante, presente en uno de los ovarios, está aún en fase de crecimiento y, por lo tanto, con capacidad de inhibir el crecimiento de los demás folículos. Condición esta que no se puede llevar a cabo en muchos casos a nivel práctico.

La transición entre el final de la

primera y el principio de la segunda oleada de crecimiento folicular del ciclo estral no es igual en todos los animales y, ni siquiera, entre los distintos ciclos estrales de una misma vaca. Sin embargo, en la mayoría de los casos la atresia del primer folículo dominante y el inicio del crecimiento del segundo se produce entre el día 8 y el 11 después de la ovulación en los ciclos estrales con dos oleadas foliculares y, como media, un día antes en los de tres oleadas (Ginther *et al.*, 1989). Cabe suponer, que es más fácil que se encuentre presente un folículo funcionalmente dominante cuando se inicia el tratamiento superovulatorio en el día 8 del ciclo que en el día 12.

Si bien muchos autores no hacen referencia a diferencias en la respuesta entre los distintos días de inicio del tratamiento (en el intervalo de los días 8 a 14 del ciclo estral), parece que sí existe una cierta tendencia a que aumente la tasa de ovulación cuanto más tarde se empieza el tratamiento (Staigmiller *et al.*, 1992) y a que los resultados sean superiores en el día 12 en términos de número de embriones transferibles recogidos (De Ruigh *et al.*, 1995). Y, aunque algún autor ha situado la mejor respuesta al iniciar el tratamiento en el día 9 (Lindsell *et al.*, 1986), la mayoría ha observado un incremento en los resultados a partir del día 10 (Lerner *et al.*, 1986; Goulding *et al.*, 1990; Staigmiller *et al.*, 1992).

El objetivo de este trabajo ha sido comprobar el posible efecto sobre la respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones iniciando el trata-

SUPEROVULACIÓN EN VACUNO LECHERO

miento superovulatorio en el día 8 o en el día 12 del ciclo estral, sin examen ecográfico previo de los ovarios.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado como donantes de embriones 32 vacas de raza Holstein-Friesian, sometidas al mismo régimen de alimentación y manejo, comprendidas entre el primer y el séptimo parto.

Antes de la realización del tratamiento superovulatorio se confirmaba que cada animal había superado los sesenta días postparto, había tenido al menos dos celos con un intervalo normal de tiempo y no presentaba ningun-

na alteración manifiesta en la exploración rectal.

Una vez cumplidos estos requisitos los animales se dividieron en dos grupos, en el primero (Grupo A, n= 16) el tratamiento superovulatorio se inició en el día 8 del ciclo estral (Día 0 = Día del celo) y en el segundo (Grupo B, n= 16) se inició en el día 12 (**tabla I**).

Los tratamientos superovulatorios utilizados fueron (**tabla I**):

- FSH de origen ovino (OVAGEN, ICP): (n= 13) una dosis total de 13,5 mg dividida, en régimen decreciente, a lo largo de cuatro días con dos administraciones diarias (2,25x2; 1,8x2; 1,44x2; 1,26x2).

- FSH-P (Shering-Plough): (n= 19)

Tabla I. *Diseño experimental.* (Experimental design).

| | | Donantes Grupo FSH-P | Donantes Grupo OVAGEN | Receptoras |
|----------------------------|--------|------------------------------------|--|---------------------|
| Día -8 | Mañana | | | 500 mg Cloprostenol |
| Día 0* | Mañana | 6 mg FSH-P | 2,25 mg OVAGEN | |
| | Tarde | 6 mg FSH-P | 2,25 mg OVAGEN | |
| Día 1 | Mañana | 5 mg FSH-P | 1,8 mg OVAGEN | |
| | Tarde | 5 mg FSH-P | 1,8 mg OVAGEN | |
| Día 2 | Mañana | 3 mg FSH-P+ 500 mg Cloprostenol | 1,44 mg OVAGEN+ 500 mg Cloprostenol | 500 mg Cloprostenol |
| | Tarde | 3 mg FSH-P+ | 1,44 mg OVAGEN | |
| Día 3 | Mañana | 2 mg FSH-P | 1,26 mg OVAGEN | |
| | Tarde | 2 mg FSH-P | 1,26 mg OVAGEN | |
| Día 4-5 | | Celo | Celo | Celo |
| Inicio del celo +12 horas | | Inseminación | Inseminación | |
| Inicio del celo + 24 horas | | Inseminación | Inseminación | |
| 1ª Inseminación +7 días | | Recogida de embriones | Recogida de embriones | Transferencia |

*Inicio del tratamiento: Grupo A= día 8 del ciclo estral; Grupo B= día 12 del ciclo estral.

una dosis total de 32 mg dividida, en régimen decreciente, a lo largo de cuatro días con dos administraciones diarias (6x2; 5x2; 3x2; 2x2).

Todos los animales recibían en el tercer día del tratamiento una dosis de 500 mg de cloprostenol con el fin de inducir la lisis del cuerpo lúteo. Las inseminaciones se realizaron a las 12 y 24 horas de las primeras manifestaciones del celo.

El lavado del útero para la recogida de los embriones se realizó a los siete días del celo, comprobándose con anterioridad, mediante recuento de estructuras ováricas por exploración rectal, si se había producido respuesta multiovulatoria. Para la recogida de los embriones se utilizaron métodos no quirúrgicos, mediante circuito cerrado (Curtis, 1992).

Tras la recogida se procedía a la búsqueda y clasificación de los embriones, los cuales se anotaban en principio como total de embriones y que se dividía después en tres grupos: embriones transferibles, embriones degenerados y retardados y ovocitos no fecundados.

Como receptoras de embriones se utilizaron un total de 104 novillas de raza Holstein-Friesian, que fueron sometidas a un programa de sincronización de celos mediante doble inyección de 500 mg de cloprostenol con un intervalo de 11 días, haciendo coincidir la segunda de las inyecciones de progestanoide con el momento en que éste era administrado a las donantes durante el tratamiento superovulatorio.

Los embriones utilizados fueron los clasificados como embriones transferibles y las transferencias se realizaron por vía transcervical el mismo día

Tabla II. Resultados obtenidos en función de la hormona utilizada. (Results obtained in function of the used hormone).

| | OVAGEN | FSH-p |
|-------------------|-------------|-------------|
| Cuerpos lúteos | 8,00±3,87 | 9,31±5,55 |
| Embriones | 4,30±3,57 | 5,89±4,60 |
| Transferibles | 3,00±2,45 | 3,73±3,41 |
| Recogida* | 56,94±27,94 | 60,36±27,19 |
| Ovoc. fecundados* | 86,75±20,73 | 87,05±24,31 |
| Transferibles* | 75,15±27,91 | 63,92±34,38 |
| Gestaciones* | 45,20±39,59 | 56,45±21,61 |

*p.100

de las recogidas de los embriones. Para la confirmación de las gestaciones todas las receptoras fueron examinadas por exploración rectal a los 50 días después de la transferencia.

El análisis estadístico consistió en el cálculo de medias, desviaciones y porcentajes y su comparación mediante un análisis de la varianza en el caso de las medias y una Chi-cuadrado en el de los porcentajes, considerando como significativos los valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto la respuesta superovulatoria (número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios) como la cantidad y calidad de los embriones obtenidos fueron muy similares con los dos productos hormonales utilizados, sin diferencias significativas en ninguno de los casos (**tabla II**), por lo que consideramos que no interfirieron en los resultados en función del día de inicio.

Aunque se ha observado que entre

SUPEROVULACIÓN EN VACUNO LECHERO

algunos de los productos comerciales de FSH hay diferencias en el total de cuerpos lúteos y de embriones obtenidos (Larocca *et al.*, 1995), siendo más efectivos, en general, los productos que contienen un baja contaminación de LH, investigaciones recientes parecen indicar que no existen claras diferencias entre FSH de diferente origen y composición (De Ruigh *et al.*, 1995; Goulding *et al.*, 1996). Por otra parte, a pesar de que puedan existir diferencias en el número total de embriones recogidos, esto no se ve plasmado en un incremento significativo del número de embriones transferibles (Larocca *et al.*, 1995).

En la **tabla III** se puede observar que en los animales en los que se inició el tratamiento en el día 12 del ciclo estral (Grupo B) tanto la respuesta superovulatoria como el número total de embriones recogidos y el número de embriones transferibles fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) a los resultados obtenidos en los animales en los que el tratamiento se inició en el día 8 (Grupo A).

Estos resultados coinciden con los publicados por otros autores, que observaron un incremento en los resultados a partir del día 10 (Lerner *et al.*, 1986; Goulding *et al.*, 1990; Staigmiller *et al.*, 1992) y en especial con el reciente trabajo de De Ruigh *et al.* (1995) que comprueba una significativa mejoría en el día 12 del ciclo estral en términos de número de embriones transferibles recogidos.

Pero no sólo es importante que el número medio de embriones transferibles sea elevado, sino que también participen en esta cifra la mayor parte de los animales. En el Grupo A, cuatro

animales no dieron ningún embrión transferible, mientras que en todos los animales del grupo B se obtuvo alguno (**figura 1**). Además, de entre los primeros, sólo seis dieron tres o más embriones transferibles repartiéndose entre ellos el 71 p.100 del total de los embriones de su grupo. En el Grupo B fueron once las donantes en las que se recogieron tres o más embriones transferibles, lo que significa que en este último grupo la respuesta fue más homogénea.

El porcentaje de ovocitos fecundados y el de embriones transferibles sobre el total (embriones y ovocitos fecundados) recogidos no presentó diferencias significativas entre ambos grupos, lo que viene a indicar que los principales causantes de las diferencias entre ambos grupos fueron, la mayor respuesta superovulatoria y el

Tabla III. Resultados obtenidos según el día de inicio del tratamiento superovulatorio. (Results obtained in function of the day of beginning of the superovulatory treatment).

| | Día 8 | Día 12 |
|-------------------|-------------|--------------------------|
| Cuerpos lúteos | 7,06±3,87 | 10,50±5,35 ¹ |
| Embriones | 3,25±2,54 | 7,25±4,68 ¹ |
| Transferibles | 1,93±1,69 | 4,93±3,37 ¹ |
| Recogida* | 47,28±24,54 | 70,66±24,99 ¹ |
| Ovoc. fecundados* | 87,11±29,67 | 87,54±13,86 |
| Transferibles* | 66,06±41,43 | 71,04±20,29 |
| Gestaciones* | 27,77±31,03 | 60,17±29,46 ¹ |

*p.100

¹Diferencias significativas entre valores en la misma línea ($p < 0,05$). (Significant difference between values in the same row ($p < 0.05$)).

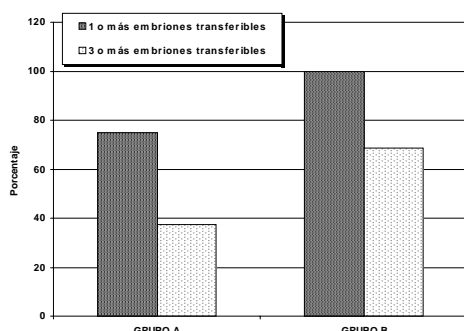


Figura 1. Distribución de los animales, en cada uno de los grupos (A: Inicio del tratamiento el día 8; B: Inicio del tratamiento el día 12), en función del número de embriones transferibles obtenidos. (Distribution of the animals, in each group (A: beginning treatment day 8; B: beginning treatment day 12), in function of the number of obtained transferable embryos).

mayor porcentaje de recogida (**tabla III**).

Está demostrado que la monitorización del folículo dominante y el control del inicio de su atresia o la inducción de su rotura en el momento de comenzar el tratamiento superovulatorio, puede permitir un incremento importante en el número de embriones transferibles obtenidos y, aunque no da lugar a una disminución en la variabilidad de los resultados (Bartmann, 1992), sí permite que un mayor número de animales tengan un mayor número de ovulaciones (Guilbault *et al.*, 1991; Huhtinen *et al.*, 1992; Bungartz y Nieman, 1994; Fricke *et al.*, 1994).

Aunque en este trabajo no se ha realizado una evaluación previa del estatus ovárico de los animales, sí es posible esperar que en una gran parte

de ellos, basándose en los estudios de dinámica folicular, el folículo dominante de la primera oleada de crecimiento folicular mantenga capacidad inhibitoria en los días 8 a 9 del ciclo (Driancourt, 1991; Roche y Boland, 1991).

La dominancia funcional del primer folículo dominante se suele mantener, como máximo, hasta el día 11 del ciclo estral (Roche y Boland, 1991). La emergencia de la segunda oleada se produce entre los días 8 a 11 (Ginther *et al.*, 1989). Y, aunque la selección del folículo dominante es manifiesta desde el día 1 después de la emergencia de la oleada (Ginther *et al.*, 1989), la irrevocable supresión de todos los folículos subordinados no es aparente hasta el día 5 del inicio de ésta (Ko *et al.*, 1991). Esto nos permite suponer que en una gran parte de los animales del grupo B, no estuviese presente un folículo dominante con máxima capacidad inhibitoria del crecimiento de los demás folículos.

Respecto a los resultados obtenidos tras las transferencias de los embriones a las receptoras, el porcentaje de gestaciones es significativamente superior ($p < 0,05$) con aquellos procedentes de las donantes del grupo B (**tabla II**). Esto podría ser un indicativo de que no solo hubo diferencias en el total de embriones que morfológicamente presentaban características de normalidad, sino que una parte de los embriones considerados como transferibles entre los procedentes del grupo A podrían tener comprometida su capacidad de desarrollo posterior.

El inicio del tratamiento superovulatorio en un momento en el que el folículo dominante mantiene dominan-

cia funcional, puede llevar a que la gonadotropina exógena estimule el reclutamiento de folículos destinados a la atresia, lo que conlleva que una parte de los ovocitos no sean fecundados (Desaulniers *et al.*, 1995), disminuya el porcentaje de recogida (Fricke *et al.*, 1994) y una parte importante de los cigotos producidos tras la superovulación presenten anomalías citogenéticas (Assey *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

La respuesta superovulatoria, en el total de embriones y número de embriones transferibles, es significativamente superior iniciando el tratamiento superovulatorio en el día 12 del ciclo estral frente al inicio en el día 9, consiguiéndose además una respuesta más homogénea y mayor porcentaje de gestaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Assey, R.J., P. Hyttel, T. Greve and B. Purwantara. 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 37: 335-344.
- Bartmann, C.P. 1992. Untersuchungen zur verbesserung der supereovulationsergebnisse beim rind durch et fernung des dominanten follikels am eierstock mit hilfe der sonographie. Vet. Med. Dissertation. Hannover.
- Bungartz, L. and H. Niemann. 1994. Assesment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fert.*, 101: 583-591.
- Curtis, J.L. 1992. Cattle embryo transfer procedure. Ed. Academic Press, INC., California, pp. 131.
- De Ruigh, L., R.E. Pearson and J.A.M. Van Wagtendonsk-De Leeuw. 1995. Are *permanent donor cows* permanent donor cows?. 11^e Colloque scientifique. Association Europeenne de Tranfert Embryonnaire, Hannover, 8 et 9 septembre 1995, pp: 158.
- Desaulniers, D.M., J.G. Lussier, A.K. Goff, D. Bousquet and L.A. Guilbault. 1995. Follicular development and reproductive endocrinology during and after superovulation in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses. *Theriogenology*, 44: 479-497.
- Driancourt, M.A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 35: 55-79.
- Fricke, P.M., J.D. Kirsch, L.P. Reinolds and D.A. Redmer. 1994. Studies of FSH induced follicular growth in cows. *Theriogenology*, 42: 43-53.
- Ginther, O.J., J.P. Kastelic and L. Knopf. 1989. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, 20: 187-200.
- Goulding, D., D.H. Willians, O. Duffy, M.P. Boland and J.F. Roche. 1990. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology*, 34: 767-778.
- Goulding, D., D.H. Willians, J.F. Roche and M.P. Boland. 1996. Factors affecting superovulation in heifers treated with PMSG. *Theriogenology*, 45: 765-773.
- Guilbault, L.A., F. Grasso, J.C. Lussier, P. Rouillier and P. Matton. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fert.*, 91: 81-89.
- Huhtinen, M., V. Rainio, P. Bredbacka and A. Mäki-Tanila. 1992. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*, 37: 457-463.
- Ko, J.C.H., J.P. Kastelic, M.R. Del Campo and

- O.J. Ginther. 1991. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fert.*, 91: 511-519.
- Larocca, C.E., A. Fernández, A.F. González and A.A. Carbo. 1995. The efficiency of different gonadotrophin preparations on the superovulatory responses of holstein cows. *Theriogenology*, 43: 261-268.
- Lerner, S.P., W.V. Thayne, R.D. Baker, T. Henschen, S. Meredith, E.K. Inskeep, R.A. Dailey, P.E. Lewis and R.L. Butcher. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 63: 176-183.
- Lindsell, C.E., R.D. Murphy and R.J. Mapletoft. 1986. Superovulatory and andocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of estrous cycle. *Theriogenology*, 26: 209-219.
- Roche, J.F. and M.P. Boland. 1991. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology*, 35: 85-90.
- Saumade, J. 1995. La production d'embryons chez les bovins: Quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements des superovulation. *INRA Productions Animales*, 8: 275-283.
- Staigmiller, R.B., R.A. Bellows, G.B. Anderson, G.E.Jr. Seidel, W.D. Foote, A.R. Menino and R.W.Jr. Wright. 1992. Superovulation of cattle with equine pituitary extract and porcine FSH. *Theriogenology*, 37: 1091-1099.

Recibido: 9-2-98. Aceptado. 17-9-98.

Archivos de zootecnia vol. 48, núm. 181, p. 50.